

Rec'd PCT/PTO 14 FEB 2005

524564

PCT/JP 03/10386

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

15.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

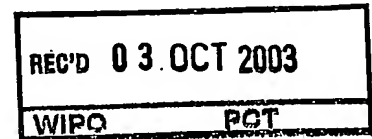
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月16日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-237411

[ST. 10/C]: [JP 2002-237411]

出 願 人
Applicant(s): 東京大学長

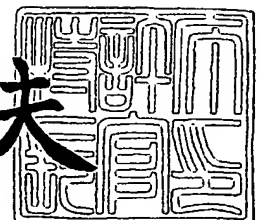


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 U2002P048

【提出日】 平成14年 8月16日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明の名称】 複数の蛋白質の間の相互作用を測定する方法

【請求項の数】 20

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県流山市江戸川台東1-179 エーデルハイム2
01

【氏名】 上田 宏

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市吉田新町1丁目2番2-10-306

【氏名】 長棟 輝行

【特許出願人】

【識別番号】 391012327

【氏名又は名称】 東京大学長 佐々木 毅

【代理人】

【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100059258

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709970

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 複数の蛋白質の間の相互作用を測定する方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベクターであって、(1)一の蛋白質又はその断片をコードするDNA配列、(2)当該一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列、(3)他の蛋白質又はその断片をコードするDNA配列、(4)ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドン、及び(5)当該他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列、の少なくとも上記5つのDNA配列を、当該ベクターの5'方向から3'方向にかけて、(1)(2)(3)(4)(5)の順番に又は(3)(4)(5)(1)(2)の順番に備える構造を有し、当該ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドンが存在することにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際には、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片の両者をその上に提示する2蛋白質提示型のファージを提供し、かつ、当該ベクターを非サプレッサー株宿主に導入した際には、当該一の蛋白質又はその断片のみをその上に提示する1蛋白質提示型のファージ及び当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該他の蛋白質又はその断片を提供することを特徴とする、ベクター。

【請求項2】 前記一の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVH断片であって、前記他の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVL断片である、請求項1記載のベクター。

【請求項3】 前記一の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVL断片であって、前記他の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVH断片である、請求項1記載のベクター。

【請求項4】 前記ベクターが大腸菌のファージベクター又はファージミドベクターである、請求項1ないし請求項3のいずれか1つの請求項記載のベクター。

【請求項5】 前記一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列が繊維状ファージのpIX蛋白質をコードするDNA配列であって、前記他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコ

ードするDNA 配列が繊維状ファージのpVII蛋白質をコードするDNA 配列である、請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか 1 つの請求項記載のベクター。

【請求項 6】 前記一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA 配列が繊維状ファージのpVII蛋白質をコードするDNA 配列であって、前記他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA 配列が繊維状ファージのpIX 蛋白質をコードするDNA 配列である、請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか 1 つの請求項記載のベクター。

【請求項 7】 前記宿主による提示切り替えを可能とする終止コドンがアンバーコドンである、請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか 1 つの請求項記載のベクター。

【請求項 8】 一の蛋白質又はその断片と他の蛋白質又はその断片との間の相互作用を測定する方法であって、

(1) 請求項 1 ないし請求項 7 のいずれか 1 つの請求項記載のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、当該一の蛋白質又はその断片のみをその上に提示した 1 蛋白質提示型のファージと、当該非サプレッサー株宿主から分泌された当該他の蛋白質又はその断片を含む培養上清を取得し、

(2) 培養上清中の当該他の蛋白質又はその断片を適切な担体に固定化し、

(3) 固定化された当該他の蛋白質又はその断片と、当該 1 蛋白質提示型のファージ上に提示された当該一の蛋白質又はその断片とを反応させて、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片とを結合させ、

(4) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片との結合能を評価する；

上記の過程よりなる、一の蛋白質又はその断片と他の蛋白質又はその断片との間の相互作用を測定する方法。

【請求項 9】 前記一の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVH断片であって、前記他の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVL断片である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 前記一の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVL断片であって

、前記他の蛋白質又はその断片が抗体可変領域のVH断片である、請求項8記載の方法。

【請求項11】 前記ベクターが大腸菌のファージベクター又はファージミドベクターである、請求項8ないし請求項10のいずれか1つの請求項記載の方法。

【請求項12】 前記一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列が繊維状ファージのpIX蛋白質をコードするDNA配列であって、前記他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列が繊維状ファージのpVII蛋白質をコードするDNA配列である、請求項8ないし請求項11のいずれか1つの請求項記載の方法。

【請求項13】 前記一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列が繊維状ファージのpVII蛋白質をコードするDNA配列であって、前記他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列が繊維状ファージのpIX蛋白質をコードするDNA配列である、請求項8ないし請求項11のいずれか1つの請求項記載の方法。

【請求項14】 前記宿主による提示切り替えを可能とする終止コドンがアンバーコドンである、請求項8ないし請求項13のいずれか1つの請求項記載の方法。

【請求項15】 前記サプレッサー変異体宿主が、大腸菌アンバーサプレッサー株である、請求項8ないし請求項14のいずれか1つの請求項記載の方法。

【請求項16】 前記大腸菌アンバーサプレッサー株が大腸菌TG1株であり、かつ前記非サプレッサー株宿主が大腸菌HB2151株である、請求項15記載の方法。

【請求項17】 抗原が存在することによりVH断片とVL断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域を得るための方法であって、

(1) 請求項2記載のベクターを用いてサプレッサー変異体宿主の形質転換を行うことにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際にはVH断片とVL断片の両者をそのファージ上に提示する、VH/VL提示型のファージを取得し、

(2) 上記(1)において取得された当該VH/VL提示型のファージと抗原との結合能を確認し、

(3) 上記(2)においてVH/VL 提示型のファージを提供することが確認された請求項2記載のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、あるいは上記(1)において取得されたVH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行うことにより、当該VH断片のみをその上に提示するVH提示型のファージと、当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該VL断片を含む培養上清を取得し、

(4) 培養上清中の当該VL断片を適切な担体に固定化し、

(5) 抗原の存在下及び非存在下で、固定化された当該VL断片とファージ上に提示された当該VH断片を反応させ、

(6) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該VH断片と当該VL断片の間の結合能を評価し、

(7) 抗原の存在下における当該VH断片と当該VL断片の間の結合能が、抗原の非存在下における当該VH断片と当該VL断片の間の結合能の2倍以上である場合に、抗原が存在することによりVH断片とVL断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域が得られたと判定する過程よりなる、上記方法。

【請求項18】 抗原が存在することによりVH断片とVL断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域を得るための方法であって、

(1) 請求項3のベクターを用いてサプレッサー変異体宿主の形質転換を行うことにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際にはVH断片とVL断片の両者をそのファージ上に提示する、VH/VL 提示型のファージを取得し、

(2) 上記(1)において取得された当該VH/VL 提示型のファージと抗原との結合能を確認し、

(3) 上記(2)においてVH/VL 提示型のファージを提供することが確認された請求項3記載のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、あるいは上記(1)において取得されたVH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行うことにより、当該VL断片のみをその上に提示するVL提示型のファージと、当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該VH断片を含む培養上清を取得し、

(4) 培養上清中の当該VH断片を適切な担体に固定化し、

(5) 抗原の存在下及び非存在下で、固定化された当該VH断片とファージ上に提示された当該VL断片を反応させ、

(6) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該VH断片と当該VL断片の間の結合能を評価し；

(7) 抗原の存在下における当該VH断片と当該VL断片の間の結合能が、抗原の非存在下における当該VH断片と当該VL断片の間の結合能の2倍以上である場合に、抗原が存在することによりVH断片とVL断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域が得られたと判定する過程よりなる、上記方法。

【請求項19】 抗体可変領域のVL断片を得る方法であって、

(1) 請求項2記載のベクターを用いて非サプレッサー宿主の形質転換を行うか、あるいは当該ベクターを有するVH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行い、

(2) 当該非サプレッサー株宿主から当該VL断片を培養上清に分泌させ、

(3) 当該培養上清から当該VL断片を精製する、

上記過程よりなる、抗体可変領域のVL断片を得る方法。

【請求項20】 抗体可変領域のVH断片を得る方法であって、

(1) 請求項3記載のベクターを用いて非サプレッサー宿主の形質転換を行うか、あるいは当該ベクターを有するVH/VL 提示型のファージを用いて非サプレッサー株宿主の形質導入を行い、

(2) 当該非サプレッサー株宿主から当該VH断片を培養上清に分泌させ、

(3) 当該培養上清から当該VH断片を精製する、

上記過程よりなる、抗体可変領域のVH断片を得る方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、蛋白質の間の相互作用、特に抗体可変領域のVH断片とVL断片の間の相互作用を測定するための方法に関する。更に本発明は本方法に使用するために構築されたベクターに関する。

【0002】

【従来の技術とその課題】

本発明者らは、抗体のVH/VL 間の相互作用を測定することで間接的に抗原濃度を測定する新規免疫測定法である、オープンサンドイッチELISA 法を開発し、特開平10-78436において開示した。抗原・抗体反応の特異性を利用した様々な免疫測定法によって、混合物中の微量の物質を高感度で検出することができるが、このオープンサンドイッチELISA 法は、従来のサンドイッチ ELISA法に比べて操作が簡便であり、また単価抗原の測定が可能であるといったメリットを有する。

【0003】

図1にサンドイッチ ELISA法（A）と、本発明者が提案したオープンサンドイッチELISA 法（B）の概念を示す模式図を示す。サンドイッチ ELISA法（A）においては、測定対象の抗原に対する1次抗体を固相上に固定し、抗原を含む溶液と酵素標識した2次抗体を順次添加して洗浄し、酵素活性により抗原濃度を定量する。一方、オープンサンドイッチELISA 法（B）においては、対象の抗原に対する抗体のVLを固定化し、抗原溶液と酵素標識したVHを同時に添加して酵素活性により定量する。本方法においてはサンドイッチ ELISA法と比較して洗浄操作を一回短縮される。

【0004】

オープンサンドイッチELISA に用いる抗体断片VH, VL には、i) 抗原に対して高い親和性を持つ、ii) 抗原非存在下でVH, VL は相互作用が弱い、等の条件が必須である。よって、測定対象の抗原に対してこの条件を満たす抗体断片を調製することが必要となる。将来的にオープンサンドイッチELISA を測定法・検出系として確立するには、本方法は広範囲の抗原にわたって測定可能な系である必要がある。よって、あらゆる抗原に対して上に述べた条件を満たすものを、膨大な抗体ライブラリーから迅速・簡便にスクリーニングすることができる系を確立することができるならば、オープンサンドイッチELISA を実用化するために役に立つと思われる。

【0005】

即ち、オープンサンドイッチELISA の実用化にあたり、抗体の抗原結合能と、

抗原の存在下、非存在下でのVH/VL 相互作用を迅速に測定できる系を利用することが極めて望ましく、本発明はこれを可能とする。本発明はまた、ライブラリー中から応答性のより高い抗体の選択を可能にすることも目的としている。

【0006】

一方、ファージ提示技術がこれまでに複数提案されている。ファージ提示技術は、各種抗体の可変領域のVH断片とVL断片を繊維状ファージの粒子上に同時に提示し、これと抗原との結合能をもって抗体の抗原結合能を評価し、さらに結合能の高い抗体を選択する技術である。ファージディスプレイ法において多くの場合には、M13, fd などの繊維状ファージのコートタンパク質であるpIIIあるいはpV III の表面にライブラリーを、融合タンパク質として発現・提示させる。

【0007】

pIIIを用いたファージディスプレイ法の概略を図2に示す。ファージのコート蛋白質pIIIをコードするgeneIII 上流にランダムな配列を導入したファージミドベクターを構築する。大腸菌を形質転換してヘルパーファージでレスキューすることにより、pIIIにランダムな配列を含む蛋白質を提示したファージが得られる。この様に作製したファージライブラリーから標的分子のスクリーニングを行い、特異的に結合するものを選択することができる。標的分子を固定化した系についてライブラリーを投入し、結合、洗浄、溶出の操作(パニング, panning)を行うことで高い結合活性を持つファージを選択できる。回収したファージについては大腸菌(E.coli)に感染させ増幅して次のサイクルに投入する。スクリーニングを繰り返すことにより、ライブラリー中の結合性ファージの比率を効果的に高めていくことができる。

【0008】

この選択系のメリットとしては、表現型と遺伝子型がリンクしているために、選択したタンパク質の配列決定が容易であること、スクリーニング中に増幅の過程が入るため効率的に目的タンパク質を濃縮できること、感染宿主を替えることによってタンパク質の切り離しが可能であることなどが挙げられる。また提示されるタンパク質としては、短い数残基のランダムペプチド、抗体断片、プロテアーゼ、ヒト成長ホルモン、核酸結合性タンパク質など多種多様なものが挙げられ

る。

【0009】

一般的には、ファージディスプレイにおいて抗体断片を提示する場合には、VH、VLをリンカーで繋げたscFv (一本鎖Fv:single chain Fv) の形を用いる。ところが近年新たなファージ提示技術として、VHにgVII proteinを、VLにgIX protein を提示させることにより、VH断片とVL断片を別々に提示させる新規な方法が報告された (Kim D. Jandaら)。図3に従来の抗体断片を一本鎖の形で提示させる方法 (A) と、上記のVH・VL断片を別々に提示させる方法 (B) の模式図を示す。

【0010】

ファージディスプレイに用いられる抗体のライブラリーとして、免疫をしていない動物のV 遺伝子から作製したナীব・ライブラリー (Naive library)、ナীব・ライブラリーの超可変部領域に人工的に変異を導入した合成ライブラリー (Synthetic library)、そして目的の抗原で免疫した動物を用いて作製した免疫ライブラリー (Immunized library) が主に挙げられる。

【0011】

ナীব・ライブラリーは抗原刺激によって親和成熟 (affinity maturation) が起こる以前のIgM 抗体のV 遺伝子を用いているために、原理的には様々な抗原に対する抗体が選択可能であること、免疫操作を必要としないためヒト型抗体のライブラリーの構築が可能であること、などのメリットがある。一方、アフィニティーを向上させるためにライブラリーのサイズを大きくすることが必要不可欠であるために、作製に手間がかかることや、不要な要素を多く含むなどのデメリットがある。合成ライブラリーはナীব・ライブラリーのCDR に部位特異的変異導入やPCR の手法により変異を導入したもので、これにより多様性を制御することができる。

【0012】

免疫ライブラリーはあらかじめ目的の抗原で免疫したマウスから抗体遺伝子を採取するため、非常に抗原特異性・結合活性の高いライブラリーが得られるメリットがある。しかし免疫に長い期間 (1~3 ヶ月) を要する、免疫応答が不可能な

毒性分子・自己分子に対する抗体の取得が困難である、ヒト型の抗体が調製しにくいなどのデメリットも挙げられる。

【0013】

上記で述べたように、これまでに、繊維状ファージの粒子上に各種抗体の可変領域のVH断片とVL断片を同時に提示させ、抗体断片を提示させた繊維状ファージと抗原の間の結合能によって抗体の抗原結合能を評価することにより、結合能の高い抗体を選択する技術（ファージ提示技術）が複数提示されている。しかしこれらの提示法では、VH断片とVL断片の両者を含む抗体可変領域全体の抗原結合能は評価できるが、VH/VL間の相互作用を評価することはできなかった。また、前記のオープンサンドイッチELISAに適した抗体断片を取得するためには、抗原非存在下で相互作用の弱いVH・VLのペアを選択することが必要である。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明は上記の課題を解決するための第1の手段として下記の、（1）一の蛋白質又はその断片をコードするDNA配列、（2）当該一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列、（3）他の蛋白質又はその断片をコードするDNA配列、（4）ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドン、及び（5）当該他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA配列、の少なくとも上記5つのDNA配列を、当該ベクターの5'方向から3'方向にかけて、（1）（2）（3）（4）（5）の順番に又は（3）（4）（5）（1）（2）の順番に備える構造を有し、当該ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドンが存在することにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際には、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片の両者をその上に提示する2蛋白質提示型のファージを提供し、かつ、当該ベクターを非サプレッサー株宿主に導入した際には、当該一の蛋白質又はその断片のみをその上に提示する1蛋白質提示型のファージ及び当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該他の蛋白質又はその断片を提供することを特徴とするベクターを提供する。

【0015】

また本発明は上記の課題を解決するための第2の手段として下記の、一の蛋白質又はその断片と他の蛋白質又はその断片との間の相互作用を測定する方法であって、

(1) 上記のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、当該一の蛋白質又はその断片のみをその上に提示した1蛋白質提示型のファージと、当該非サプレッサー株宿主から分泌された当該他の蛋白質又はその断片を含む培養上清を取得し、

(2) 培養上清中の当該他の蛋白質又はその断片を適切な担体に固定化し、

(3) 固定化された当該他の蛋白質又はその断片と、当該1蛋白質提示型のファージ上に提示された当該一の蛋白質又はその断片とを反応させて、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片とを結合させ、

(4) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該一の蛋白質又はその断片と当該他の蛋白質又はその断片との結合能を評価する；

上記の過程よりなる、一の蛋白質又はその断片と他の蛋白質又はその断片との間の相互作用を測定する方法を提供する。

【0016】

また本発明は上記の課題を解決するための第3の手段として下記の、抗原が存在することによりVH断片とVL断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域を得るための方法であって、

(1) 抗体可変領域のVH断片及びVL断片をコードするDNA配列を含む上記のベクターを用いてサプレッサー変異体宿主の形質転換を行うことにより、当該ベクターをサプレッサー変異体宿主に導入した際にはVH断片とVL断片の両者をそのファージ上に提示する、VH/VL提示型のファージを取得し、

(2) 上記(1)において取得された当該VH/VL提示型のファージと抗原との結合能を確認し、

(3) 上記(2)においてVH/VL提示型のファージを提供することが確認された上記のベクターを用いて非サプレッサー株宿主の形質転換を行うことにより、あるいは上記(1)において取得されたVH/VL提示型のファージを用いて非サプレ

ッサー株宿主の形質導入を行うことにより、当該VH断片のみをその上に提示したVH提示型のファージと当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該VL断片を含む培養上清、あるいは当該VL断片のみをその上に提示したVL提示型のファージと当該非サプレッサー株宿主から培養上清中に分泌された当該VH断片を含む培養上清、のいずれかを取得し、

(4) 培養上清中の当該VL断片又は当該VH断片を適切な担体に固定化し、

(5) 抗原の存在下及び非存在下で、固定化された当該VL断片とファージ上に提示された当該VH断片、又は固定化された当該VHとファージ上に提示された当該VL断片を反応させ、

(6) 標識された抗ファージ抗体を用いた免疫測定法により、ファージの固体化量を測定することにより、当該VH断片と当該VL断片の間の結合能を評価し、

(7) 抗原の存在下における当該VH断片と当該VL断片の間の結合能が、抗原の非存在下における当該VH断片と当該VL断片の間の結合能の2倍以上である場合に、抗原が存在することによりVH断片とVL断片の間の相互作用が変化する抗体可変領域が得られたと判定する過程よりなる、上記方法を提供する。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明は、抗体のVH/VL間の相互作用を測定することを可能とする新規な方法である。本発明の方法は、オープンサンドイッチELISA法に用いる目的により適した抗体の選択を可能とする。本発明は、抗体cDNA断片を組み込むためのファージミドベクター、当該ベクターによって形質転換したサプレッサー大腸菌あるいは非サプレッサー大腸菌、これにヘルパーファージを感染させて作製したファージおよび可溶性抗体断片を含む培養上清から構成される。

【0018】

目的物質（抗原）との結合能を有する抗体可変領域cDNAとVH、VL断片を組み込んだファージミドベクターを作製し、当該ファージミドベクターをアンバーサプレッサー大腸菌に形質転換し、ヘルパーファージで感染させることにより常法でファージを作製する。このファージはその粒子上にVH、VLの両者を提示しており、可変領域（VH + VL）の抗原結合能を確認することができる。同じファージを

非アンバーサプレッサー大腸菌に形質転換してファージを調製すると、下記において詳細に述べる提示切り替えによってVL断片は培養上清に分泌され、VH断片のみがファージ上に提示された形で同様に培養上清に得られる。

【0019】

菌体培養液を遠心し、培養上清をVL断片結合性を持つプロテインL をコートしたマイクロプレートに注ぐ。このとき、VL断片は固相化されるのでVH/VL 断片相互作用の強弱に応じて、ファージのマイクロプレートへの固定化量が変化する。これをペルオキシダーゼ標識抗ファージ抗体を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) で測定すれば、簡単にVH/VL 断片間の相互作用を測定することができる。よって本方法により、従来より飛躍的に簡便に抗体VH/VL 相互作用を評価することが可能となる。また本発明の方法によって抗原結合性の高い抗体断片を選択することができる。

【0020】

また測定の際に抗原を共存させることによって、抗原によってVH/VL 間の相互作用が大きく変化するクローンを迅速にスクリーニングすることができる。VH/VL 間の相互作用が弱い抗体断片においては、担体上に固定化されたVL断片とファージ上に提示されたVH断片が直接に結合することは少なく、そのために担体上ファージが結合することはほとんどない。しかし、一部の抗体では抗原が存在する場合にはVH断片とVL断片が共に抗原と結合し、複合体が安定化するために、抗原を介してファージが担体に結合することができる。よって、担体に結合しているファージの量を、例えば抗ファージ抗体を用いて定量することにより、抗原の存在によりファージ結合量が大きく変化する抗体断片を選択することができる。そのような抗体断片はVH/VL 間の相互作用が抗原の結合により大きく変化すると考えられ、オープンサンドイッチELISA を行うのに際して好適である。なお、抗原の存在により抗体可変領域のVH断片とVL断片の間の相互作用が2倍以上変化するならば、そのような抗体断片は本目的のために使用することが可能である (Suzuki et al., Anal. Biochem., 286, 238-246 (2000))。

【0021】

なお本方法を実施するにあたり、ファージミドベクターを使用することは好適

である。ファージミドベクターは繊維状ファージゲノムの一部を含むようにして作製されたプラスミドであるために、ファージミドベクターを用いて大腸菌を形質転換した後、更にヘルパーファージに感染させる必要がある。これによって粒子形成のためのコート蛋白質が供給されて、ヘルパーファージ粒子とファージミド粒子が混合したファージが得られる。この際に使用するヘルパーファージは下記の実施例において使用しているM13K07ヘルパーファージは特に好ましいが、それに限定されるものではない。またより簡便な方法として、必要なDNA 配列を含むファージベクターを利用することもまた可能である。ファージベクターの場合には、当該ファージベクターを大腸菌に感染させることによって直接ファージを得ることが可能であり、ヘルパーファージを使用する必要はない。

【0022】

本願明細書において「提示切り替え」とは、サプレッサー変異体宿主に導入された時には前記「一の蛋白質」と前記「他の蛋白質」の両蛋白質をファージ上に提示するが、非サプレッサー株宿主に導入された時には一つの蛋白質をファージ上に提示し、他のもう一つの蛋白質を分泌するという切り替えの現象を意味する。なお本願明細書中において、両蛋白質を提示しているファージを「2蛋白質提示型のファージ」と、一つの蛋白質をファージ上に提示するファージを「1蛋白質提示型のファージ」と称する。「1蛋白質提示型のファージ」が取得された場合には、「1蛋白質提示型のファージ」の上に上記「一の蛋白質」が提示されると共に、上記「他の蛋白質」をコードする遺伝子が大腸菌内で発現して菌体外へ分泌される。

【0023】

なお上記の蛋白質が抗体可変領域断片である場合には特に、VH断片とVL断片の両者を提示しているファージを「VH/VL 提示型のファージ」と称する。また、VH断片をファージ上に提示してVL断片は大腸菌より培養上清中に分泌する場合を「VH提示型の培養上清」と、VL断片をファージ上に提示してVH断片を培養上清中に分泌する場合を「VL提示型の培養上清」と、それぞれ称する。

【0024】

上記の提示切り替えは、提示切り換えを可能とする終止コドンが存在すること

によって可能となる。提示切り換えを可能とする終止コドンとして、下記の実施例で使用しているアンバーコドンは特に好ましい。なおアンバーコドンは、タンパク質合成終止コドンの一つであるTAG のコドンである。しかし本発明で使用される終止コドンはそれに限定される訳ではなく、それ以外の終止コドンであるオパールコドン (TGA) やオーカーコドン (TAA) もまた同じ目的において使用することができる。

【0025】

アンバーコドンを有しているベクターが大腸菌のアンバーサプレッサー株に導入された時には、当該終止コドンの読み違い (アンバーサプレッション) が一定の割合で起こって菌体内で融合蛋白質が発現するために、上記の2蛋白質提示型のファージを得ることができる。一方非サプレッサー株宿主に導入された場合にはアンバーサプレッションを起こさないので、アンバーコドンは正確に終止コドンとして認識されて融合蛋白質は発現せず、アンバーコドンの下流に存在する遺伝子がコードするタンパク質は分泌されて提示切り換えが起こる。なおオパールコドンをオパールサプレッションを起こすサプレッサー変異体宿主に導入することにより、またオーカーコドンをオーカーサプレッションを起こすサプレッサー変異体宿主に導入することによっても、提示切り換えを起こすことが可能である。

【0026】

本発明の目的でサプレッサー変異体宿主として使用することができるのはsupEあるいはglnVを持つ菌であり、その例としては大腸菌TG1 株、XL1-Blue株、DH5 α 株、JM109 株および NM522株などを挙げることができる。なお、非サプレッサー宿主としては大腸菌JM105 株、NV1184株やHB2151株などを挙げることができる。しかし本発明において使用するサプレッサー変異体宿主と非サプレッサー宿主は、繊維状ファージが感染可能なF' プラスミドを保持している必要はあるが、上記に述べたものに限定されるものではなく、同等に機能を有する他の宿主に変更することができる。

【0027】

本発明の方法において使用するベクターは、(1) 一の蛋白質又はその断片を

コードするDNA 配列、(2) 当該一の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA 配列、(3) 他の蛋白質又はその断片をコードするDNA 配列、(4) ホストによる提示切り替えを可能とする終止コドン、及び(5) 当該他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA 配列からなる。当該ベクターは(1) (2) (3) (4) (5) をその順番に、又は(3) (4) (5) (1) (2) の順番に備えることができる。

【0028】

この様な構成を有するベクターは、上記「一の蛋白質」をファージ上に提示する。一方、「他の蛋白質又はその断片をコードするDNA 配列」と「当該他の蛋白質又はその断片をファージ上に提示するためのDNA 配列」の間に提示切り替えを可能とする終止コドンが存在するために、非サプレッサー株宿主に導入した際には「他の蛋白質」は融合蛋白質としてファージ上に発現せず、提示切り替えによって培養上清中に分泌される。

【0029】

上記の「蛋白質又はその断片をファージ上に提示するための蛋白質をコードするDNA 配列」として使用することが可能なDNA 配列は、好ましくは繊維状ファージの表面蛋白質をコードするDNA 配列である。その例として繊維状ファージの表面蛋白質をコードするDNA 配列であるpVII蛋白質、pIX 蛋白質、pIIIおよび pVIIをコードしているDNA 配列を挙げることができるが、特に好ましいのは下記の実施例で使用している繊維状ファージのpVII蛋白質あるいはpIX 蛋白質をコードしているDNA 配列である。しかしそれらに限定されるものではなく、他のファージ表面蛋白質をコードするDNA 配列も、当該DNA 配列が目的とする蛋白質と融合蛋白質を作製することが可能であって本発明の目的のために使用できる蛋白質をコードする限り、適宜選択して使用することができる。

【0030】

本発明の方法は、抗体のVH断片とVL断片の間の相互作用を測定する目的において特に優れている。しかし本発明の方法は理論的には、抗体の可変領域断片以外の、ヘテロダイマーとして存在している多量体蛋白質において、当該多量体蛋白質を繊維状ファージの上に提示してダイマーを構成しているモノマー間の相互作

用を評価する目的で使用する事が可能である。例えばある特定のモノマーである「一の蛋白質」と、それとは異なるモノマーである「他の蛋白質」の相互作用を測定することは基礎研究の現場のみならず、臨床的な診断の目的においても重要である。本発明において「一の蛋白質」と「他の蛋白質」は限定されるものであるとは解されるべきではなく、本発明の方法は、蛋白質相互間の相互作用を測定することを可能とする新規な技術を提供するものである。

【0031】

本発明の方法によって得られた、抗原非存在下でVH/VL 相互作用が弱く、かつ抗原存在下でVH/VL 相互作用が強い抗体を用いて、例えば以下のような測定キットを作製することが可能である。

- 1) VL断片をビオチン・アビジン相互作用を利用して、または物理的吸着を利用してチューブあるいはマイクロプレートに固定化する。
- 2) VH断片とレポーター酵素（例えばアルカリフォスファターゼ）との融合蛋白質を作製しておき、これをサンプルと共にVLを固定化した固相と一定時間接触させる。
- 3) 洗浄後、固相化された酵素活性を測定し、サンプル中の抗原濃度の指標とする。

【0032】

また、以下の測定キットを作製することもまた可能である。

- 1) VH断片とVL断片を互いに吸収・蛍光スペクトル重なる二種類の蛍光色素（例えばフルオレセインとローダミン）で標識しておく。
- 2) これらをサンプルと混合し、5分程度において短波長側の蛍光色素のみを励起光で励起する。二種類の蛍光色素由来の蛍光強度を測定することで、VH/VL の会合による蛍光エネルギー移動現象を検出することができる。二つの蛍光強度の比をサンプル中の抗原濃度の指標とする。この方法では前の方法に比べて、短時間で洗浄操作なしに抗原濃度が測定できる。

【0033】

また、以下の測定キットを作製することもまた可能である。

- 1) VH断片とVL断片を、それぞれ単体では活性がないか、低いのが近接させると活

性の増大する二種類の酵素断片（例えばLacZ $\Delta\alpha$ およびLacZ $\Delta\omega$ ）との融合蛋白質として大腸菌で発現させ、精製しておく。

2) 二種類の融合蛋白質とサンプルを混合し、一定時間おいたのち基質（例えば発光基質Galacton Plus）と混合し、融合蛋白質複合体の活性を測定することでサンプル中の抗原濃度の指標とする。この方法では、前の2つの方法に比べてはるかに高感度に抗原濃度を測定することが可能であり、また洗浄操作を含まない(Yokozeki et al., Anal. Chem. 74 (11), 2500-2504, 2002)。

【0034】

本発明方法によって測定する対象としては、第一に臨床検査における血清中の特定蛋白質、ペプチド、各種ホルモン、麻薬あるいは治療用薬物等が考えられる。また、環境水中のダイオキシン、ビスフェノールA、ノニルフェノール等の毒性が疑われる化学物資や農薬類もまた本発明によって測定される対象となる。

【0035】

下記の実施例において、提案した非サプレッサー株によるVL提示切り替えが適切に行われているかどうかについて検討を行った。より具体的には、本発明者らによってオープンサンドイッチELISA が可能であることが既に示されている抗HEL (Hen Egg-White Lysozyme, ニワトリ卵白リゾチーム) 抗体のHyHEL-10を用いてスクリーニングのモデル系を構築し、提案した系が機能することを実験的に証明した。構築したgIX protein にVH、gVII proteinにVLを別々に提示 (split Fv) させるファージミドベクターpKS1について、ホストのE.coliの代替によるVL提示の切り替えをオープンサンドイッチELISA により確認した。

【0036】

下記の実施例の選択の第1段階において、VH・VL提示型のファージを用いた。作製したベクターによりE.coli TG1, XL1-Blueなどのアンバーサプレッサー株を形質転換した場合には、アンバーコдонは一定の割合で読み違いが起りグルタミン酸に置換される。菌体内ではpIX-VH、pVII-VL の融合タンパク質が発現し、ヘルパーファージの感染によってVH・VL提示型のファージを得ることができる。

【0037】

選択の第2段階において、上記において得られた結合活性の高いファージを、

E.coli HB2151 のような非サプレッサー株に感染させ、ヘルパーファージによるレスキューで、VH提示のファージと遊離のVL断片を培養上清に得る。この場合はアンバーコドンが正確に終止コドンとして認識されるため、得られるファージはいずれもVHのみを提示している。VLの上流には分泌シグナルであるompA配列を配置しており、ファージ粒子と同様に菌体外へ分泌される。

【0038】

【実施例】

以下において実施例を示し、さらに詳しくこの発明の実施の形態について説明する。

(a) 抗リゾチーム抗体HyHEL-10遺伝子をg7g9上に提示するファージミドベクターの構築

ポリメラーゼ連鎖増幅(PCR) 法により必要となる断片を作製し、これらを連結させて目的ファージミドベクターを作製した。PCR の条件は下の表1にまとめた。なお、表1において反応条件はいずれも94℃で5min.x1, (94℃ 30sec, 55℃ 30sec, -72℃ 1min.)x35, 72℃ 8min.x1であり、DNA ポリメラーゼはいずれも2.5unit/100 μl KOD ポリメラーゼ(Toyobo)である。

【0039】

【表1】

	back primer	forward primer	template
VH	M13RV	VIIIfor2X	pCANTAB-5E/ HyHEL-10
VL	VK2Back	Reverse SEQ	pCANTAB-5E/ HyHEL-10
g9-ompA(linker)	LinkBack	LinkFor	pHSG397/ g9-ompA
VH-linker	M13RV	LinkFor	VH, linker
linker-VL	LinkBack	Reverse SEQ	linker, VL
VH-linker-VL	M13RV	Reverse SEQ	VH-linker, linker-VL

【0040】

(OmpA-FLAG のクローニング)

プラスミドpFLAG-ATS (Sigma-Aldrich) を鋳型とし、VLのN 末端に配置する大

腸菌ompA分泌シグナル配列およびFLAGタグ配列をPCR法により増幅した。プライマー配列には増幅断片5'側および、3'側にそれぞれ制限酵素部位Xba I、Sal Iが導入されるよう設計した。クローニングベクターpHSG397(TakaraBio, Kyoto, Japan)へクローニングした後、蛍光DNAシーケンサーSQ-5500 (Hitachi)、Thermosequencing kit (Amersham Bioscience)を用いてシーケンスを確認した(以下pHSG397/ ompA-FLAG)。

Back: ompXbaRV

5' -CGGGGTCGACTGTGCACTTTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAG-3'

Forward: ompApaSalFR

5' -CACGGAGTCTGCGTAAGATGTATCAGCACCAGCAGTATAAATAGATGAGACCCACTCCAG-3'

【0041】

(gene IX, gene VIIのクローニング)

ヘルパーファージM13K07(TakaraBio)から一本鎖DNAを調製し、これを鋳型にしてPCR法によりgene VII, gene IXの配列を増幅した。それぞれの5'および3'側に、制限酵素切断部位としてgene VIIではKpn IおよびEcoRI、gene IXではXho IおよびXba Iを導入するため以下のプライマーを用いた。

Back: g7KpnRV

5' -CGGGGGTACCGCAGGTCGCGGATTTCGAC-3'

Forward: g7EcoFR

5' -CGGGGAATTCTCATCTTTGACCCCCAGCG-3'

Back: g9XhoRV

5' -CGGGCTCGAGCGGTGGAGGCGGTCAATGAGTGTTTTAGTGTATTCTTTTC-3'

Forward: g9XbaFR

5' -CGGGTCTAGATCATGAGGAAGTTTCCATTAAAC-3'

【0042】

増幅されたgene VII断片はEcoRIおよびKpnIで切断してpBlueScript II KS+ (Toyobo)へ、gene IX断片はXhoIおよびXbaIで切断してpHSG397/ ompA-FLAGへクローニングし、そのシーケンスを確認した(以下pBS-g7およびpHSG397/ ompA-g9)。

【0043】

(リンカーの作製)

オーバーラップ・イクステンション (Overlap-extension) PCRによるVH-linker-VL (HyHEL-10) の作製

VH, VL, Linkerを以下のプライマーを用いてそれぞれPCR増幅した後、VH-linker、linker-VLの各断片をオーバーラップ・イクステンションPCRにより増幅した。さらにVH-linker、linker-VLのオーバーラップ・イクステンションPCRによりVH-linker-VLの断片を得た。この断片を両端のNco I、Not Iで制限酵素切断した。

【0044】

LinkerのPCR:

Back: LinkBackX

5' -GGGACCACGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTCAATG-3'

Forward: LinkFor

5' -AGACTGGGTGAGCTCAATGTCCGTCGACTGTGCACTTTTGTC-3'

VH(HyHEL-10)のPCR:

Back: M13RV

5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Forward: VH1For2X

5' -GACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC-3'

VL(HyHEL-10)のPCR:

Back: Vκ2Back

5' -GACATTGAGCTACCCAGTCTCCA-3'

Forward: ReverseSEQ

参考 5' -GTAAAACGACGGCCAGT-3'

【0045】

(ファージミドベクター pKS1の構築)

ファージミドベクターpKS1はpK1 (Kristensen, P., and Winter, G. (1998) Folding & Design 3, 321-328) を改変したpScFv3上に構築した。まずPCR法によ

り抗ウシ血清アルブミン(BSA) 一本鎖抗体(scFv)をコードするファージミドベクターpIT(13CG2) (de Wildt, R. M., Mundy, C. R., Gorick, B. D., and Tomlinson, I. M. (2000) Nat Biotechnol 18, 989-994) をテンプレートとし、プライマーM13RV およびMycAKpnFor(5' -CCGGGTACCTATGCGGCCCCATTCAGATC-3') で抗BSA scFvおよびHis-Myc タグをコードするDNA 断片を増やし、これをSfi I で切断後T4 DNAポリメラーゼを用いて平滑化したのちKpn I で処理し精製した。

【0046】

次にこれをファージミドベクターpK1 をgIII遺伝子5' 近傍のPst I で処理した後T4 DNAポリメラーゼで平滑化しKpn I で処理した断片とライゲーションさせた。この、抗BSA scFv遺伝子-His-Mycタグを持つベクターpScFv3をKpnI、EcoRI で処理し、これに KpnI、EcoRI で処理したpBS-g7から得たgene VII断片を挿入した(pScFv/g7)。続いてNco I, Not Iで処理したVH-linker-VLをpScFv/g7 へ挿入し、pKS1を得た。ファージミドベクターpKS1の配列を図4に示す。

【0047】

(ファージの作製 (VH・VL提示型、VH提示型))

構築したファージミドpKS1 (アンピシリン耐性) により形質転換した大腸菌を対数増殖期に達するまで37℃で2TYAG培地(2TY+アンピシリン:100 μ g/ μ L, グルコース:2%)100mL で培養し、O.D.600=0.5 の時点で培養液中の10 mL へ、菌体量に対し20当量のヘルパーファージM13K07を加えた。37℃で30 min. 静置した後、グルコースを含む培養上清を除去し、100mL の2TYAK 培地(2TY+アンピシリン:100 μ g/mL, Km:25 μ g/mL) で再懸濁し30℃で終夜培養した。次に培養液を4000g, 15min 遠心し、上清を回収して20% PEG6000・2.5M NaClを1/5 vol.加え氷上で1h 静置し、4000g, 15min 遠心して沈殿物を2ml のTE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)で再懸濁した。再び遠心して上清を回収し、ファージ溶液を得た。得られたファージについてはタイターを測定(後述)し、ファージ粒子の濃度をコロニー形成能(タイター, cfu, colony forming unit/ mL)により決定した。

【0048】

i) サプレッサー株

プラスミドpKS1により大腸菌アンバーサプレッサー株TG-1及びXL-1Blueを形質

転換し、pIX にVH、pVIIにVLを提示したVH, VL 両者提示型のファージを得た。

ii) 非サプレッサー株

pKS1により大腸菌非サプレッサー株HB2151を形質転換し、pIX にVHを提示しVLを提示していないファージ、及び遊離のVL断片を含むファージ溶液を得た。このファージについてはPEG NaClによる沈殿の過程を省き、培養上清をそのまま用いた。

【0049】

(ファージタイターの測定)

ファージの濃度の目安としてタイターを測定した。対数増殖期まで2TY 培地で培養した大腸菌 TG1 100 μ L ~1 mL に、原液をPBS で1000倍希釈したファージ溶液1 μ L を入れ、37℃で30 min. 静置して感染させた。その後2TY 培地で希釈し、各希釈溶液から10 μ L を2TYAG プレート上にスポッティングした。終夜放置後に各スポットで形成されたコロニー数を数えて、ファージ原液1 mLから何個のコロニーが形成されたかを計算しファージ濃度の指標とした。

【0050】

(ファージELISA)

ポリスチレン製96穴マイクロプレートの各ウェルに1~10 μ g/mLの一次抗体または抗原の溶液を100 μ L 入れ、4℃で一晩固定化した。次にウェルの水分を除去した後、各wellに200 μ L の1 %スキムミルクを含むPBS (MPBS)を入れ、2 h. 室温で静置しブロッッキングした。続いてプレートを0.1% Tween20を含むPBS(PBST)で3 回洗浄し、 10^{11} ~ 10^{12} cfu/mLのファージ溶液(MPBS 中) を100 μ L 入れて37℃で1h. 静置した。マイクロプレートを3 回洗浄し、MPBSで5000倍希釈したHRP 標識抗ファージ抗体 (マウス抗-M13 HRP, アマシャムバイオサイエンス) を各ウェルへ100 μ L ずつ添加し室温で1h. 静置した。

【0051】

マイクロプレートをPBSTで3 回洗浄し、あらかじめ調製した酵素反応溶液(50mL 100mM酢酸ナトリウム pH6.0, TMBZ(in DMSO)500 μ L, H₂O₂ 10 μ L)を各wellへ添加して反応を開始した。暗所で10~30 min. 反応させた後3.2N H₂SO₄を50 μ L ずつ添加して反応を止め、プレートリーダーで吸光度を測定した(450 nm, 対照は65

0 nm)。

【0052】

(オープンサンドイッチELISA)

基本的な操作は上述のファージELISAと同様に行った。タグを付加したVLを固定化する一次抗体(α FLAG-M2 または α myc 9E10) をマイクロプレート上に固定化しブロッキングした後、濃度既知の抗原(HEL, 0.6~10 μ g/mL) をあらかじめ混ぜたファージ溶液(1%MPBS中)を100 μ L 入れ37°Cで1h. 静置した。以降ファージELISAと同様にHRP 標識抗ファージ抗体の酵素活性を吸光度により測定した。

【0053】

(VL断片提示の確認)

ファージに提示されたVLのN 末端にはmyc tag が、C 末端にはFLAG tagが組み込まれており、抗体断片の提示を確認するためにこれらのtag に対する抗体を用いてファージELISA を行った。この結果、少なくともVL断片は十分に提示が行われていることが示唆された。提示の確認の結果を図5に示す。

【0054】

(抗原結合活性の確認)

抗体断片VH・VLがファージに充分提示されているか、またファージに提示されたVH・VLが充分な結合活性、抗原特異性を保持しているかどうかを確認するため、HEL を固定化したマイクロプレートを用いてファージELISA を行った。この結果、ファージ濃度 10^9 (cfu/mL) 以上において抗原に対する特異的な結合が確認でき、このことからVHの提示も充分に行われていることが明らかになった。抗原結合活性の確認の結果を図6に示す。

【0055】

(scFvとsplitFv の比較)

HyHEL-10 をscFv型及びsplitFv 型で提示した各ファージについて、抗原(HEL) を固定化したELISA を行い抗原結合活性を比較した。SplitFv 型においてもscFvと同様に充分な結合活性を示していることから、従来と同様の選択条件により結合性ファージのスクリーニングが可能なが示された。なお図7は 10^{10} cfu/mlにおける結果であり、図8は 10^9 cfu/mlにおける結果である。

【0056】

(VH提示型ファージの作製)

(大腸菌 HB2151 : 非サプレッサー株の形質転換)

構築したベクター pKS1 について、非サプレッサー株である大腸菌HB2151の形質転換を行い、M13K07ヘルパーファージでレスキューしてファージを作製した。得られたファージにはVHのみが提示され、VLはファージと共に培養上清に分泌される。同様にタイターを測定し以降の実験に用いた。

【0057】

(非サプレッサー株による提示切り替えの確認)

非サプレッサー株によって、アンバーによる提示の切り替えが充分に行われているかどうかを確認するため、培養上清を直接用いて抗原(HEL) 濃度0~10 μ g/mLの範囲においてオープンサンドイッチELISA を行った。ファージ濃度1 $\times 10^{11}$ (cfu/mL)においてHEL に特異的な濃度依存的なシグナルの上昇が見られたことから、切り替えは充分に起こっていると考えられた。またVLの分泌についても充分量行われていることが示唆された。結果を図9に示す。また、この実験系における提示切り替えのしくみを示す模式図を図10に示す。

【0058】

また実際にスクリーニングを行う時には、VH/VL 提示型のファージライブラリーから選択した抗原に強い結合を示す各クローンについて96穴プレートで培養を行いファージを作製するが、96穴プレートにおける培養上清のファージタイターはウェルのどの位置においてもそれほど差異はなくおよそ 10^{12} のオーダーであることから、直接オープンサンドイッチELISA によりスクリーニングが行えることが示唆された。

【0059】

(ファージミドベクターpKS2の作製)

前項で作製したpKS1は、抗体クローニングのための制限酵素部位としてVH上流に6塩基認識NcoIサイトしか持って居らず、内部にNcoI切断部位をもつ遺伝子断片の挿入は難しいという欠点があった。これを改良するため、NcoIに加えて8塩基認識SfiIをクローニングに用いることのできるベクターpKS2を作製した。

【0060】

具体的にはPKS1(HyHEL-10)をNcoIおよびEcoRI で切断し、0.8 kbの挿入断片をNcoIおよびEcoRI で切断したファージミドベクターpCantab5E(アマシャムバイオサイエンス)にライゲーションさせ組み込んだ。

【0061】

(ターミネーターを組み込んだファージミドベクターの作製)

挿入する抗体遺伝子によっては発現誘導前の融合蛋白質発現が大腸菌の生育に有害となり、挿入した遺伝子が高率で欠損する現象が見受けられた。これを防ぐため、転写開始信号の前と、融合遺伝子下流にグルタミンパーメアーゼ (glutamine permease) オペロン由来の転写終結配列 (ターミネーターtHP, Nohno, T. et al., Mol. Gen. Genet. (1986) 205:260-269) を挿入した。これにより、非誘導時にファージミドベクター中に存在するプロモーター様配列から転写開始されるmRNAからの融合蛋白質発現を減少させることが出来ると期待された。

【0062】

ファージミドベクターpKS2をLac プロモーター上流のSapI部位で切断し、ここに以下の4種のオリゴヌクレオチドをリン酸化後アニールさせて作製したターミネーター遺伝子を挿入した。

tHP1 5' -AGC GGT ACC CGA TAA AAG CGG CTT CCT GAC-3'

tHP2 5' -AGG AGG CCG TTT TGT TTT GCA GCC CAC CTC-3'

tHP3 5' -GCT GAG GTG GGC TGC AAA ACA AAA CGG CCT-3'

tHP4 5' -CCT GTC AGG AAG CCG CTT TTA TCG GGT ACC-3'

組み換えたファージミドは、そのシーケンスを決定し設計通りの配列となっていることを確認した(pKS2T)。

【0063】

次に、pKS2T を融合遺伝子下流にあるEcoRI 部位で切断し、以下の2つのプライマーおよびtHP2, tHP3をアニールさせて作製したターミネーター遺伝子を挿入した。

tHP7 5' -AAT TGG TAC CCG ATA AAA GCG GCT TCC TGA C-3'

tHP8 5' -AAT TGA GGT GGG CTG CAA AAC AAA ACG GCC T-3'

遺伝子の挿入されたファージミドのシーケンスを決定したところ、EcoRI 部位にターミネータ遺伝子が2個タンデムに挿入されていた。これをpKST2 とした。

【0064】

(オープンサンドイッチ法に適した抗体の判別)

このシステムを用いてある抗体がオープンサンドイッチ法に適しているかどうかを判別可能かどうか検討した。抗体遺伝子として、抗ニワトリ卵白リゾチーム抗体HyHEL-10およびD1.3を用いた。D1.3はVH-VL 相互作用が抗原結合の有無にかかわらず強い事が知られている。D1.3 Fv 遺伝子をテンプレートとし、上記と同様にPCR でsplit Fv遺伝子を作製し、pKST2 に組み込んだ。非サプレッサー株であるHB2151を形質転換し、ヘルパーファージM13K07を用いてVH提示ファージおよび分泌型VLを含む培養上清を調製した。

【0065】

この上清および抗原を抗FLAGタグ抗体を固定化したマイクロプレートに注ぎ、ファージ結合の抗原濃度依存性を調べた結果、D1.3を用いた場合、サンプル中のリゾチーム濃度を変えてもVL断片を介して固相化されるファージの量は殆ど変化しなかった。これに対し、HyHEL-10を用いた場合、サンプル中のリゾチーム濃度に応じてVL断片を介して固相化されるファージ量が顕著に増加した。このことから、この系がオープンサンドイッチ法に適した抗体の簡便なスクリーニング法として機能することが確かめられた。結果を図11に示す。

【0066】

(モデルパニング)

このシステムを用いて特異的結合抗体を提示するファージの選択が可能であることを証明するため、二種の特異性の異なるファージ抗体の混合液から目的の特異性を持ったファージ抗体をパニング法で濃縮することを試みた。

【0067】

ファージミドとして、HyHEL-10をコードするsplit Fvを提示可能なpKST2-H10 (H10) および抗フルオレセインsplit Fvを提示可能なpKST2-31IJ3 (IJ3) を用いた。これらを形質転換した大腸菌TG-1にヘルパーファージM13K07を感染させ、split Fv提示ファージを作製した。これらを MPBS 100 μ l 中のtiter が

H10:IJ3=10⁵:10¹¹あるいは10⁹:10¹¹となる様に混合したファージ液を調製し、ニワトリ卵白リゾチームHEL を固定化したマイクロプレートに注いで37℃1時間置き、PBS-T で2回、PBS で2回洗浄し100 μ Lの0.2 M Glycine-HCl (pH 2.2), 1 mg/ml ウシ血清アルブミンを注ぎ溶出されたファージを6 μ l の2M Tris で中和し対数増殖期の大腸菌TG-1に感染させた(一回目のパニング)。これをYTAGプレートにまいて37℃一晩おき、コロニーを48個回収してそれぞれを培養し、ファージを調製した(モノクローナルファージ)。これと共に残りのコロニーを集めてこれから同様にファージを調製し、再度HEL を固定化したマイクロプレートを用いたパニングを行った。そして48クローンからモノクローナルファージを調製し、それぞれについて、HEL への結合能をELISA 法で測定した。

【0068】

この結果、1:10⁶ および1:10² のどちらの混合比でも1回目のパニングで顕著なHEL 結合クロンの濃縮が見られ、全クローン中結合クロンの割合はそれぞれ37.5%および50%となった。また2回目のパニングにより、どちらの混合比の場合も80% 以上が陽性クローンとなることがわかった(図12)。

【0069】

【発明の効果】

本発明により、抗体可変領域のVH断片とVL断片の間の相互作用を測定するための新規な方法が与えられた。本発明の方法は蛋白質の間の相互作用を検出する目的で、広く使用することが可能である。本発明の方法に従って、アンバーコドンを含むファージミドベクターによってアンバーサプレッサー株大腸菌を形質転換してファージを調製すると、VH・VL断片の両者がファージ粒子上に提示される。一方非アンバーサプレッサー株大腸菌を形質転換してファージを調製した際には、アンバーコドンが存在するために、VH断片のみがファージ粒子上に提示されて、VL断片は培養上清中に分泌されるという提示切り替えが起こる。培養上清中に分泌されたVL断片を固相に固定化し、ファージ上に提示されたVH断片との相互作用を定量化することにより、VH断片とVL断片の間の相互作用を測定することが可能である。

【 0 0 7 0 】

【配列表】

<110> President of Tokyo University

<120> A method to determine interaction between plural proteins

<160> 21

<210> 1

<211> 4301

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of phagemid vector pKS1-HyHel10

<400>

```

AGCTTTGGAG CCTTTTTTTT GGAGATTTTC AACGTGAAAA AATTATTATT CGCAATTCCT   60
TTAGTTGTTC CTTTCTATTC TCACAGTGCA CAGGTCCAAC CGGCCATGGC CGAGGTGCAG  120
CTGCAGGAGT CAGGACCTAG CCTCGTGAAA CCTTCTCAGA CTCTGTCCCT CACCTGTTCT  180
GTCACTGGCG ACTCCATCAC CAGTGATTAT TGGAGCTGGA TCCGGAAATT CCCAGGGAAT  240
AGACTTGAGT ACATGGGGTA CGTAAGCTAC AGTGGTAGCA CGTACTACAA TCCATCTCTC  300
AAAAGTCGAA TCTCCATCAC TCGAGACACA TCCAAGAATC AGTACTATCT GGACCTGAAT  360
TCTGTGACTA CTGAGGACAC AGCCACATAT TACTGTGCAA ACTGGGACGG TGATTACTGG  420
GGCCAAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCGAGC GGTGGAGGCG GTTCAATGAG TGTTTTAGTG  480
TATTCTTTTCG CCTCTTTTCGT TTTAGGTTGG TGCCTTCGTA GTGGCATTAC GTATTTTACC  540
CGTTTAATGG AACTTCCTC ATGATCTAGA AGGAGATATC ATATGAAAAA GACAGCTATC  600
GCGATTGCAG TGGCACTGGC TGGTTTCGCT ACCGTTGCGC AAGCTGACTA CAAGGACGAC  660
GATGACAAAA GTGCACAGTC GACGGACATT GAGCTCACCC AGTCTCCAGC CACCCTGTCT  720
GTGACTCCAG GAAATAGCGT CAGTCTTTCC TGCAGGGCCA GCCAAAGTAT TGGCAACAAC  780
CTACACTGGT ATCAACAAAA ATCACATGAG TCTCCAAGGC TTCTCATCAA GTATGCTTCC  840
CAGTCCATCT CTGGGATCCC CTCCAGGTTC AGTGGCAGTG GATCAGGGAC AGATTTCACT  900
CTCAGTATCA ACAGTGTGGA GACTGAAGAT TTTGGAATGT ATTTCTGTCA ACAGAGTAAC  960
AGCTGGCCGT ACACGTTTCGG AGGGGGGACC AAGCTGGAAA TCAAACGGGC GGCCGCACAT 1020

```

CATCATCACC ATCACGGGGC CGCAGAACAA AAACCTCATCT CAGAAGAGGA TCTGAATGGG 1080
 GCCGCATAGG TACCGCAGGT CGCGGATTTC GACACAATTT ATCAGGCGAT GATACAAATC 1140
 TCCGTTGTAC TTTGTTTCGC GCTTGGTATA ATCGCTGGGG GTCAAAGATG AGAATTCACT 1200
 GGCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT 1260
 TGCAGCACAT CCCCCTTTCG CCAGCTGGCG TAATAGCGAA GAGGCCCGCA CCGATCGCCC 1320
 TTCCCAACAG TTGCGCAGCC TGAATGGCGA ATGGCGCCTG ATGCGGTATT TTCTCCTTAC 1380
 GCATCTGTGC GGTATTTTCAC ACCGCATATA AATTGTAAAC GTTAATATTT TGTAAAAATT 1440
 CGCGTTAAAT TTTTGTAAAT TCAGCTCATT TTTTAACCAA TAGGCCGAAA TCGGCAAAAT 1500
 CCCTTATAAA TCAAAAGAAT AGCCCGAGAT AGGGTTGAGT GTTGTTCAG TTTGGAACAA 1560
 GAGTCCACTA TTAAAGAACG TGGACTCCAA CGTCAAAGGG CGAAAAACCG TCTATCAGGG 1620
 CGATGGCCCA CTACGTGAAC CATCACCCAA ATCAAGTTTT TTGGGGTCGA GGTGCCGTAA 1680
 AGCACTAAAT CGGAACCCTA AAGGGAGCCC CCGATTTAGA GCTTGACGGG GAAAGCCGGC 1740
 GAACGTGGCG AGAAAGGAAG GGAAGAAAGC GAAAGGAGCG GGCGCTAGGG CGCTGGCAAG 1800
 TGTAGCGGTC ACGCTGCGCG TAACCACCAC ACCCGCCGCG CTTAATGCGC CGCTACAGGG 1860
 CGCGTACTAT GGTGCTTTG ACGGGTGAC TCTCAGTACA ATCTGCTCTG ATGCCGCATA 1920
 GTTAAGCCAG CCCCAGACAC CGCCAACACC CGCTGACGCG CCCTGACGGG CTTGTCTGCT 1980
 CCCGGCATCC GCTTACAGAC AAGCTGTGAC CGTCTCCGGG AGCTGCATGT GTCAGAGGTT 2040
 TTCACCGTCA TCACCGAAAC GCGCGAGACG AAAGGGCCTC GTGATACGCC TATTTTTATA 2100
 GGTAAATGTC ATGATAATAA TGGTTTCTTA GACGTCAGGT GGCACTTTTC GGGGAAATGT 2160
 GCGCGGAACC CCTATTTGTT TATTTTTCTA AATACATTCA AATATGTATC CGCTCATGAG 2220
 ACAATAACCC TGATAAATGC TTCAATAATA TTGAAAAAGG AAGAGTATGA GTATTCAACA 2280
 TTTCCGTGTC GCCCTTATTC CCTTTTTTGC GGCATTTTGC CTTCTGTTT TTGCTCACCC 2340
 AGAAACGCTG GTGAAAGTAA AAGATGCTGA AGATCAGTTG GGTGCACGAG TGGGTTACAT 2400
 CGAACTGGAT CTCAACAGCG GTAAGATCCT TGAGAGTTTT CGCCCCGAAG AACGTTTTCC 2460
 AATGATGAGC ACTTTTAAAG TTCTGCTATG TGGCGCGGTA TTATCCCGTA TTGACGCCGG 2520
 GCAAGAGCAA CTCGGTCGCC GCATACACTA TTCTCAGAAT GACTTGTTG AGTACTCACC 2580
 AGTCACAGAA AAGCATCTTA CGGATGGCAT GACAGTAAGA GAATTATGCA GTGCTGCCAT 2640
 AACCATGAGT GATAAACTG CGGCCAACTT ACTTCTGACA ACGATCGGAG GACCGAAGGA 2700
 GCTAACCGCT TTTTGCACA ACATGGGGGA TCATGTAAC CGCCTTGATC GTTGGGAACC 2760

GGAGCTGAAT GAAGCCATAC CAAACGACGA GCGTGACACC ACGATGCCTG TAGCAATGGC 2820
AACAACGTTG CGCAAACATAT TAACTGGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCCC GGCAACAATT 2880
AATAGACTGG ATGGAGGCGG ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG CCCTTCCGGC 2940
TGGCTGGTTT ATTGCTGATA AATCTGGAGC CCGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC 3000
AGCACTGGGG CCAGATGGTA AGCCCTCCCG TATCGTAGTT ATCTACACGA CGGGGAGTCA 3060
GGCAAATATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCCTCAC TGATTAAGCA 3120
TTGGTAACTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTAA AACTTCATTT 3180
TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA AAATCCCTTA 3240
ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCCTAGAA AAGATCAAAG GATCTTCTTG 3300
AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAACA AAAAAACCAC CGCTACCAGC 3360
GGTGGTTTGT TTGCCGGATC AAGAGCTACC AACTCTTTTT CCGAAGGTAA CTGGCTTCAG 3420
CAGAGCGCAG ATACCAAATA CTGTCCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA 3480
GAACTCTGTA GCACCGCCTA CATACTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG TGGCTGCTGC 3540
CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGA CTCAAGA CGATAGTTAC CGGATAAGGC 3600
GCAGCGGTCG GGCTGAACGG GGGGTTTCGTG CACACAGCCC AGCTTGAGC GAACGACCTA 3660
CACCGAACTG AGATACCTAC AGCGTGAGCA TTGAGAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG 3720
AAAGGCGGAC AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTCCGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT 3780
TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCCTGTCCGG TTTCCGCCACC TCTGACTTGA 3840
GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG CCAGCAACGC 3900
GGCCTTTTTA CGGTTCTTGG CCTTTTGCTG GCCTTTTGCT CACATGTTCT TTCCTGCGTT 3960
ATCCCCTGAT TCTGTGGATA ACCGTATTAC CGCCTTTGAG TGAGCTGATA CCGCTCGCCG 4020
CAGCCGAACG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC GCCCAATACG 4080
CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATGC AGCTGGCAGC ACAGGTTTCC 4140
CGACTGAAA GCGGGCAGTG AGCGCAACGC AATTAATGTG AGTTAGCTCA CTCATTAGGC 4200
ACCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCCGGC TCGTATGTTG TGTGGAATTG TGAGCGGATA 4260
ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACCA TGATTACGCC A 4301

<210> 2

<211> 4294

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of phagemid vector pKS2-HyHel10

<400>

```

AGCTTGCATG CAAATTCTAT TTCAAGGAGA CAGTCATAAT GAAATACCTA TTGCCTACGG    60
CAGCCGCTGG ATTGTTATTA CTCGCGGCC AGCCGGCCAT GGCCGAGGTG CAGCTGCAGG   120
AGTCAGGACC TAGCCTCGTG AAACCTTCTC AGACTCTGTC CCTCACCTGT TCTGTCACTG   180
GCGACTCCAT CACCAGTGAT TATTGGAGCT GGATCCGGAA ATTCCCAGGG AATAGACTTG   240
AGTACATGGG GTACGTAAGC TACAGTGGTA GCACGTACTA CAATCCATCT CTCAAAAGTC   300
GAATCTCCAT CACTCGAGAC ACATCCAAGA ATCAGTACTA TCTGGACCTG AATTCTGTGA   360
CTACTGAGGA CACAGCCACA TATTACTGTG CAAACTGGGA CGGTGATTAC TGGGGCCAAG   420
GGACCACGGT CACCGTCTCG AGCGGTGGAG GCGGTTCAAT GAGTGTTTTA GTGTATTCTT   480
TCGCCTCTTT CGTTTTAGGT TGGTGCCTTC GTAGTGGCAT TACGTATTTT ACCCGTTTAA   540
TGGAAACTTC CTCATGATCT AGAAGGAGAT ATCATATGAA AAAGACAGCT ATCGCGATTG   600
CAGTGGCACT GGCTGGTTTC GCTACCGTTG CGCAAGCTGA CTACAAGGAC GACGATGACA   660
AAAGTGCACA GTCGACGGAC ATTGAGCTCA CCCAGTCTCC AGCCACCCTG TCTGTGACTC   720
CAGGAAATAG CGTCAGTCTT TCCTGCAGGG CCAGCCAAAG TATTGGCAAC AACCTACACT   780
GGTATCAACA AAAATCACAT GAGTCTCCAA GGCTTCTCAT CAAGTATGCT TCCCAGTCCA   840
TCTCTGGGAT CCCCTCCAGG TTCAGTGGCA GTGGATCAGG GACAGATTTC ACTCTCAGTA   900
TCAACAGTGT GGAGACTGAA GATTTTGGAA TGTATTTCTG TCAACAGAGT AACAGCTGGC   960
CGTACACGTT CGGAGGGGGG ACCAAGCTGG AAATCAAACG GGCGGCCGCA CATCATCATC  1020
ACCATCACGG GGCCGCAGAA CAAAACTCA TCTCAGAAGA GGATCTGAAT GGGGCCGCAT  1080
AGGTACCGCA GGTCGCGGAT TTCGACACAA TTTATCAGGC GATGATACAA ATCTCCGTTG  1140
TACTTTGTTT CGCGCTTGGT ATAATCGCTG GGGGTCAAAG ATGAGAATTC ACTGGCCGTC  1200
GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCCT GGC GTTACCC AACTTAATCG CCTTGCAGCA  1260
CATCCCCCTT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCCC GCACCGATCG CCCTTCCCAA  1320
CAGTTGCGCA GCCTGAATGG CGAATGGCGC CTGATGCGGT ATTTTCTCCT TACGCATCTG  1380
TGCGGTATTT CACACCGCAT ATAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA  1440

```

AATTTTGTGTT AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT 1500
AAATCAAAAG AATAGCCCGA GATAGGGTTG AGTGTGTGTC CAGTTTGGAA CAAGAGTCCA 1560
CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC 1620
CCACTACGTG AACCATCACC CAAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA 1680
AATCGGAACC CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GCGGAACGTG 1740
GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG 1800
GTCACGCTGC GCGTAACCAC CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTAC 1860
TATGGTTGCT TTGACGGGTG CACTCTCAGT ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC 1920
CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA 1980
TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG 2040
TCATCACCGA AACGCGCGAG ACGAAAGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT 2100
GTCATGATAA TAATGGTTTC TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA 2160
ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA 2220
CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT 2280
GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TCGGCATTT TGCCTTCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG 2340
CTGGTGAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG 2400
GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAACGTTT TCCAATGATG 2460
AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG 2520
CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA 2580
GAAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG 2640
AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC 2700
GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG 2760
AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG 2820
TTGCGCAAAC TATTAAGTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC 2880
TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG 2940
TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG 3000
GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT 3060
ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA 3120
CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTAAATTT 3180

AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTGTAT AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG 3240
TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT 3300
TTTTTTCTGC GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT 3360
TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG 3420
CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT 3480
GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC 3540
GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GCGCAGCGG 3600
TCGGGCTGAA CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA 3660
CTGAGATACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG 3720
GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG 3780
GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA 3840
TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT 3900
TTACGGTTCC TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTTCCTGC GTTATCCCCT 3960
GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG CCGCAGCCGA 4020
ACGACCGAGC GCAGCGAGTC AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCCAAT ACGCAAACCG 4080
CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC GATTCATTAA TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCCGACTGG 4140
AAAGCGGGCA GTGAGCGCAA CGCAATTAAT GTGAGTTAGC TCACTCATTG GGCACCCAG 4200
GCTTTACACT TTATGCTTCC GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG ATAACAATTT 4260
CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCA 4294

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for ompA secretion signal sequence and FLAG tag sequence (B
ack:ompXbaRV)

<400>

CGGGGTCGAC TGTGCACTTT TGTCATCGTC GTCCTGTAG

40

<210> 4

<211> 60

<212> DNA .

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for ompA secretion signal sequence and FLAG tag sequence (Forward: ompApaSalFR)

<400>

CACGGAGTCT GCGTAAGATG TATCAGCACC AGCAGTATAA ATAGATGAGA CCCACTCCAG 60

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for KpnI site of gene VII (Back:g7KpnRV)

<400>

CGGGGGTACC GCAGGTCGCG GATTTCGAC 29

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for EcoRI site of gene VII (Forward: g7EcoFR)

<400>

CGGGGAATTC TCATCTTTGA CCCCCAGCG 29

<210> 7

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for XhoI site of gene IX (Back: g9XhoRV)

<400>

CGGGCTCGAG CGGTGGAGGC GGTTCATGA GTGTTTTAGT GTATTCTTTC

50

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for XbaI site of gene IX (Forward: g9XbaFR)

<400>

CGGGTCTAGA TCATGAGGAA GTTCCATTA AAC

33

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for linker of HyHEL-10 (Back:LinkacX)

<400>

GGGACCACGG TCACCGTCTC GAGCGGTGGA GCGGTTCAA TG

42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for linker of HyHEL-10 (Forward: LinkFor)

<400>

AGACTGGGTG AGCTCAATGT CCGTCGACTG TGCAC TTTTG TC

42

<210> 11

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for VH of HyHEL-10 (Back: M13RV)

<400>

CAGGAAACAG CTATGAC

17

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for VH of HyHEL-10 (Forward: VH1For2X)

<400>

GACGGTGACC GTGGTCCCTT GGCCCC

26

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for VL of HyHEL-10 (Back: V κ 2Back)

<400>

GACATTGAGC TCACCCAGTC TCCA

24

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for VL of HyHEL-10 (Forward: ReverseSEQ)

<400>

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer MycAKpnFor

<400>

CCGGGTACCT ATGCGGCCCC ATTCAGATC

29

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP1)

<400>

AGCGGTACCC GATAAAAGCG GCTTCCTGAC

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP2)

<400>

AGGAGGCCGT TTTGTTTTGC AGCCACCTC

30

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP3)

<400>

GCTGAGGTGG GCTGCAAAC AAAACGGCCT

30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP4)

<400>

CCTGTCAGGA AGCCGCTTTT ATCGGTACC

30

<210> 20

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP7)

<400>

AATTGGTACC CGATAAAAGC GGCTTCCTGA C

31

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for incorporation of terminator gene (tHP8)

<400>

AATTGAGGTG GGCTGCAAAA CAAAACGGCC T

31

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、サンドイッチELISA と、オープンサンドイッチELISA の原理を示す模式図である。

【図2】 図2は、ファージディスプレイ法の原理を示す模式図である。

【図3】 図3は、抗体断片を一本鎖の形で提示させる方法と、VH・VL断片を別々に提示させる方法の原理を示す模式図である。

【図4】 図4は、ファージミドベクターpKS の配列を示す模式図である。

【図5】 図5は、ELISA により抗体提示の検討を行った結果を示すグラフである。

【図6】 図6は、ELISA により抗原結合活性の検討を行った結果を示すグラフである。

【図7】 図7は、HyHEL10 を提示したscFv型とspilitFv型のファージにおいて、 10^{10} cfu/mlのファージ濃度で、ELISA によりHEL 結合活性の検討を行った結果を示すグラフである。

【図8】 図8は、HyHEL10 を提示したscFv型とspilitFv型のファージにおいて、 10^9 cfu/mlのファージ濃度で、ELISA によりHEL 結合活性の検討を行った結果を示すグラフである。

【図9】 図9は、pKS1(HyHEL10)/sup+について、オープンサンドイッチELISA を行った結果を示すグラフである。

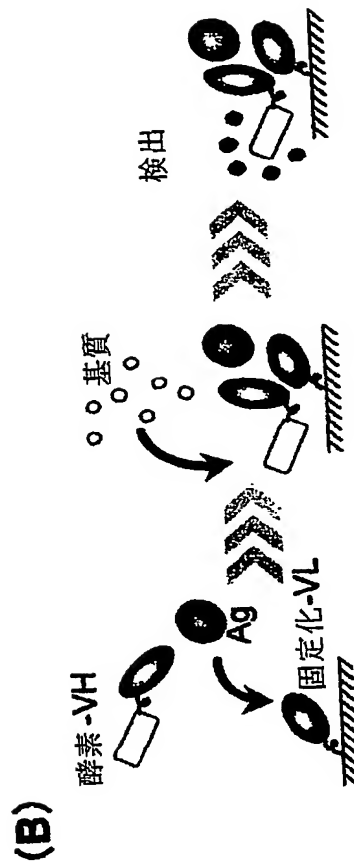
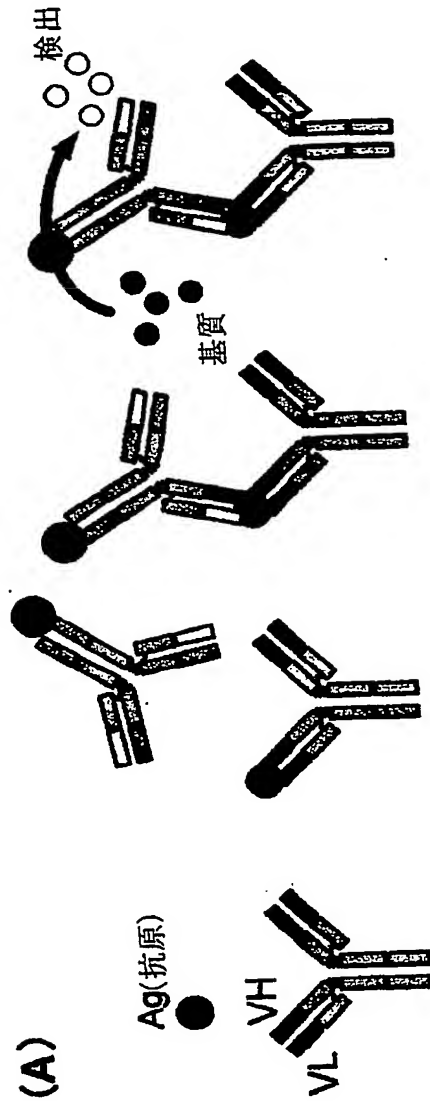
【図10】 図10は、この実験系における提示切り替えのしくみを示す模式図である。

【図11】 図11は、HyHEL10 とD1.3を用いたオープンサンドイッチELISA の結果を示すグラフである。

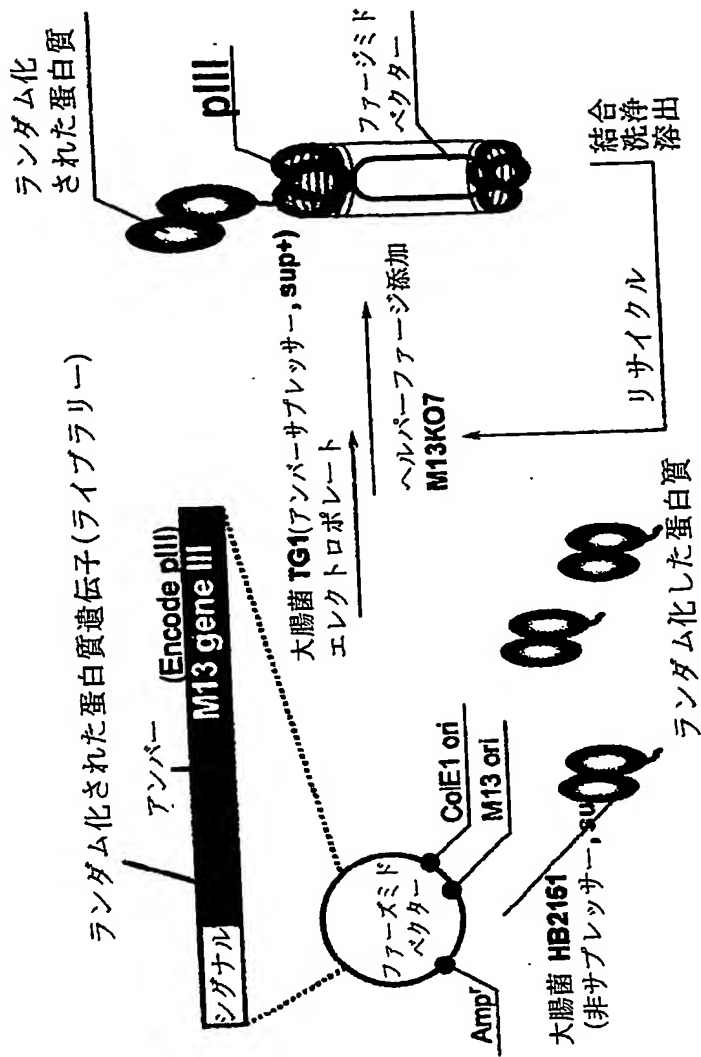
【図12】 図12は、パニングを行った際の陽性クローンの割合を示すグラフである。

【書類名】 図面

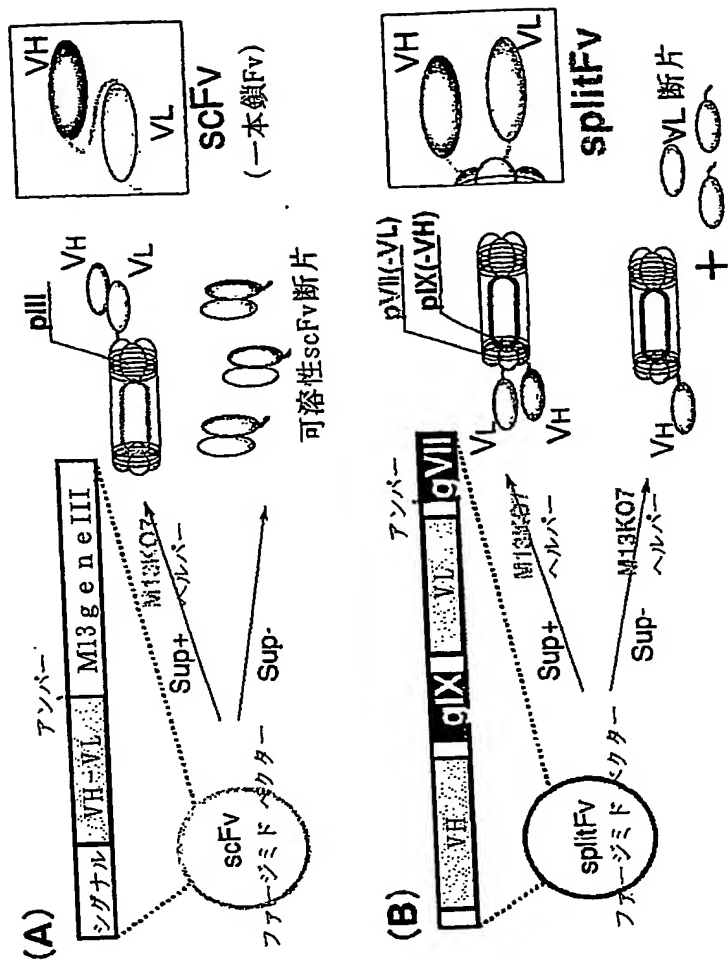
【図 1】



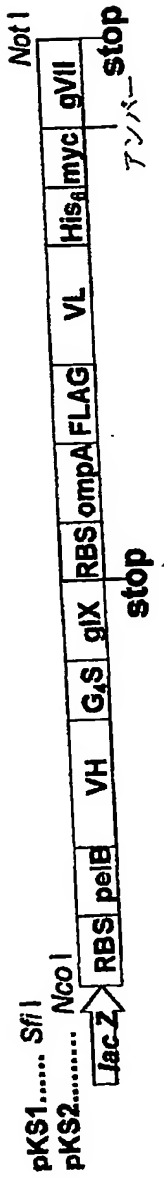
【圖 2】



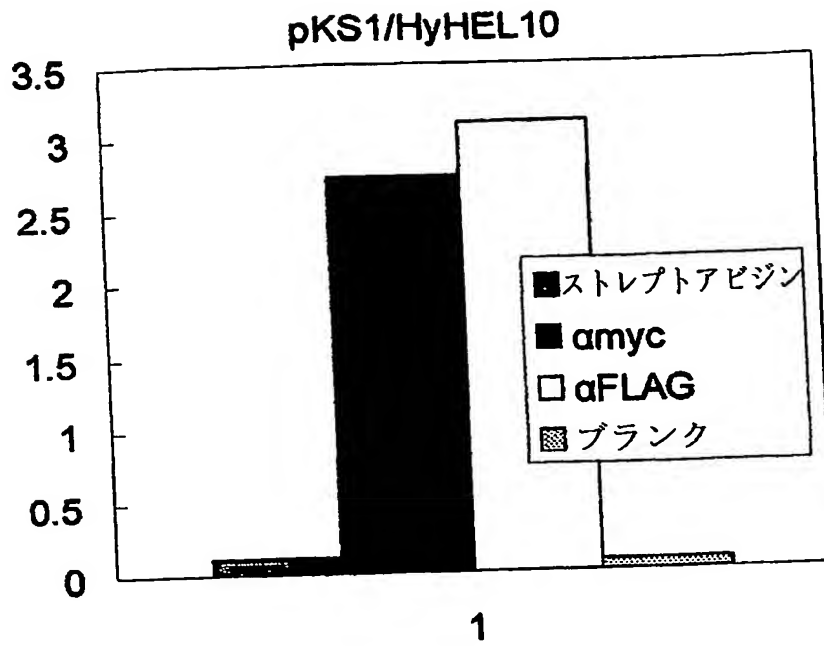
【図 3】



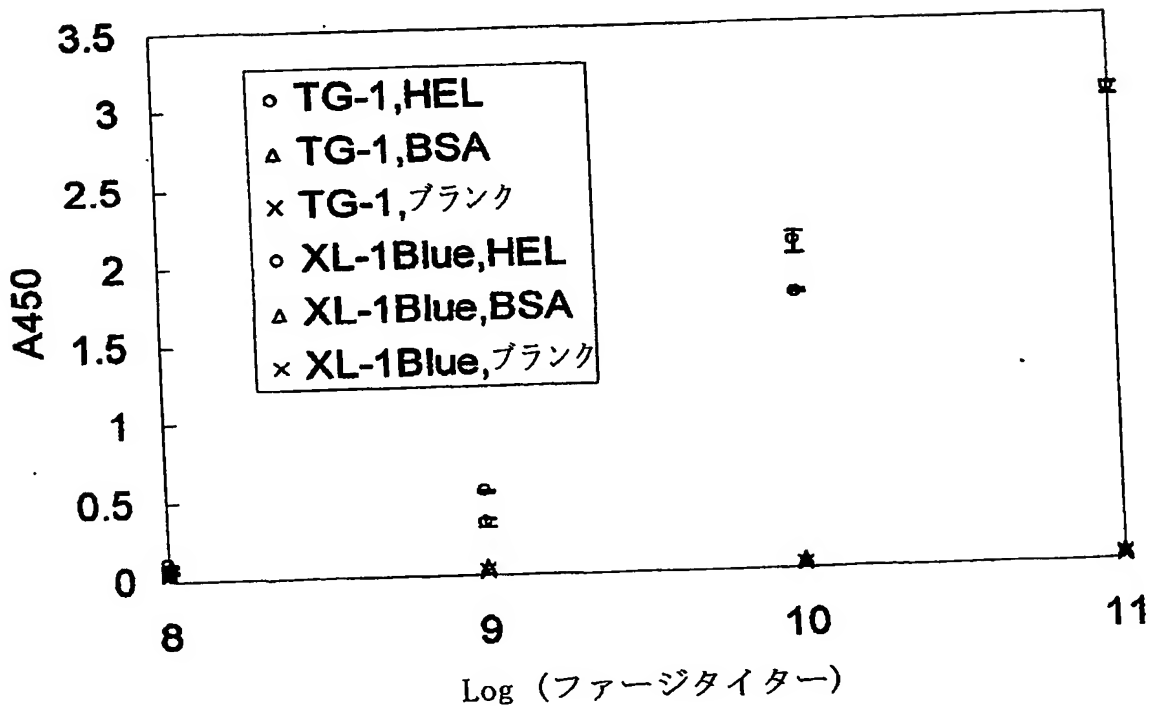
【図4】



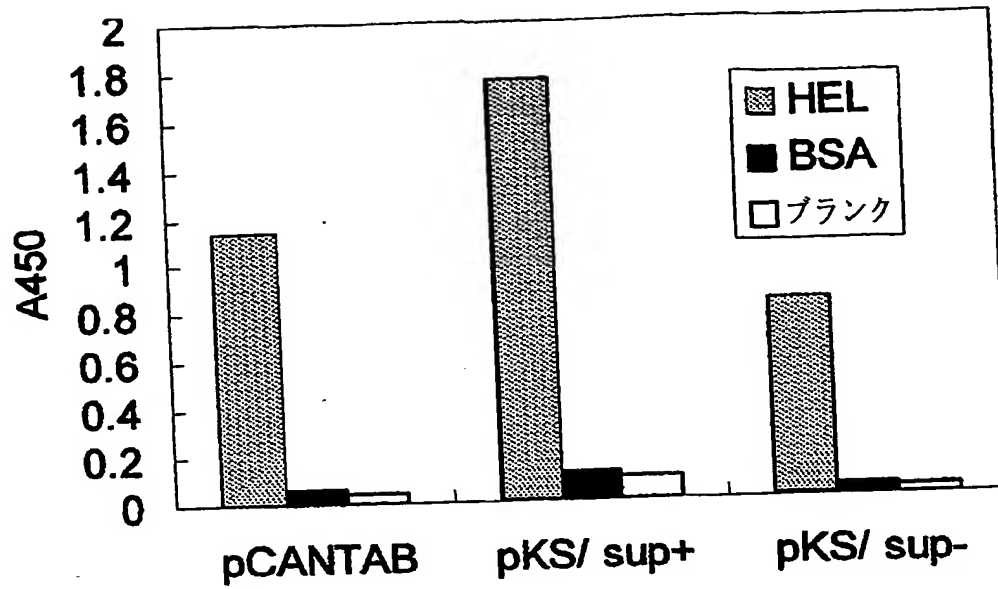
【図5】



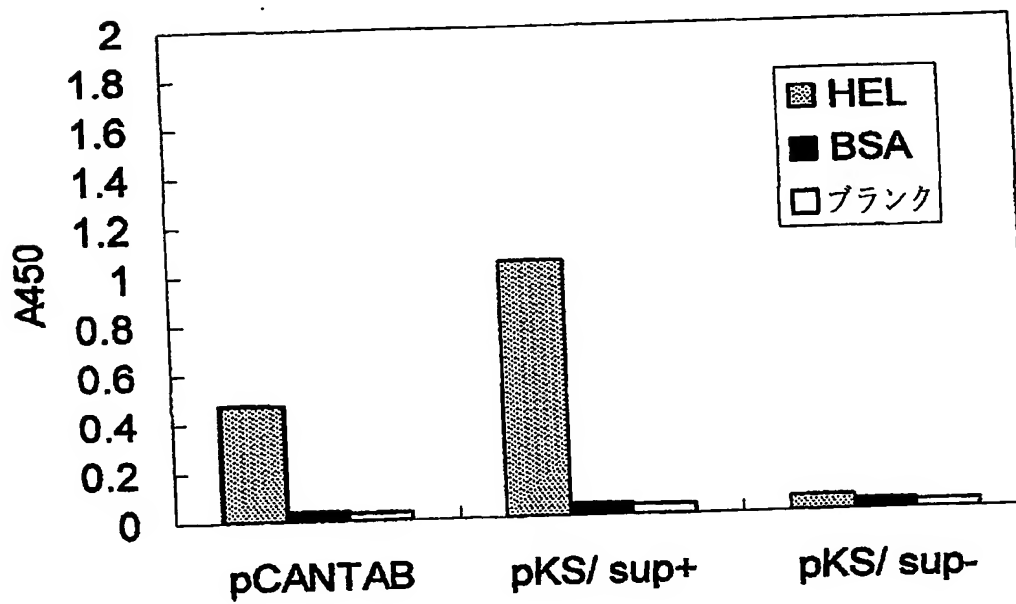
【図6】



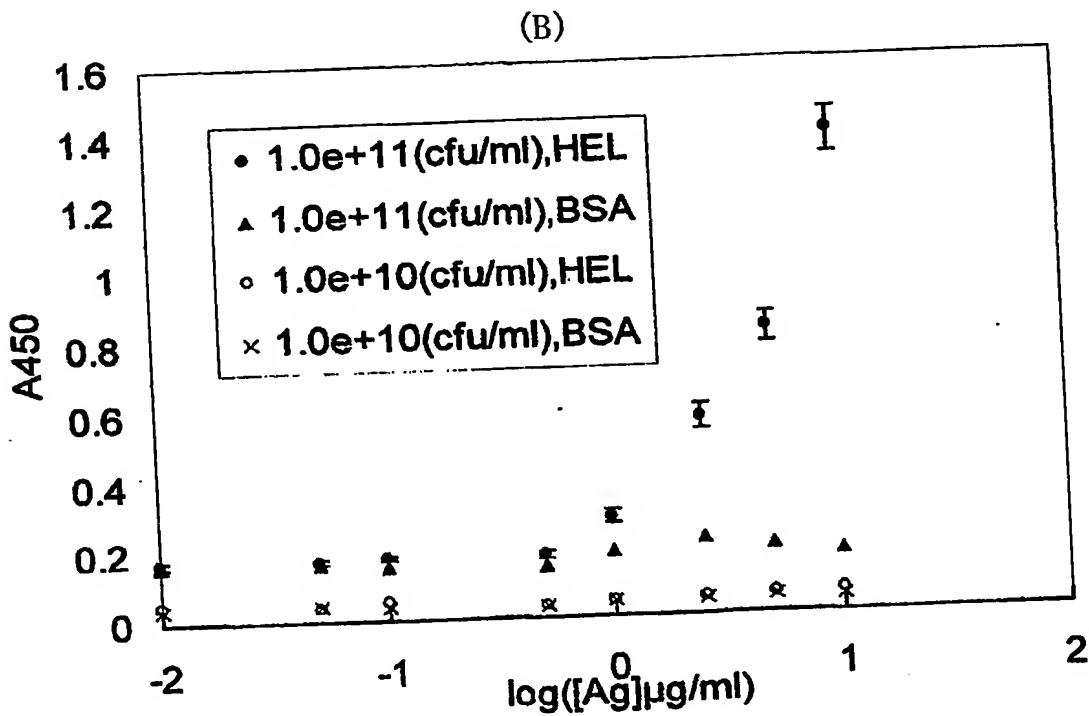
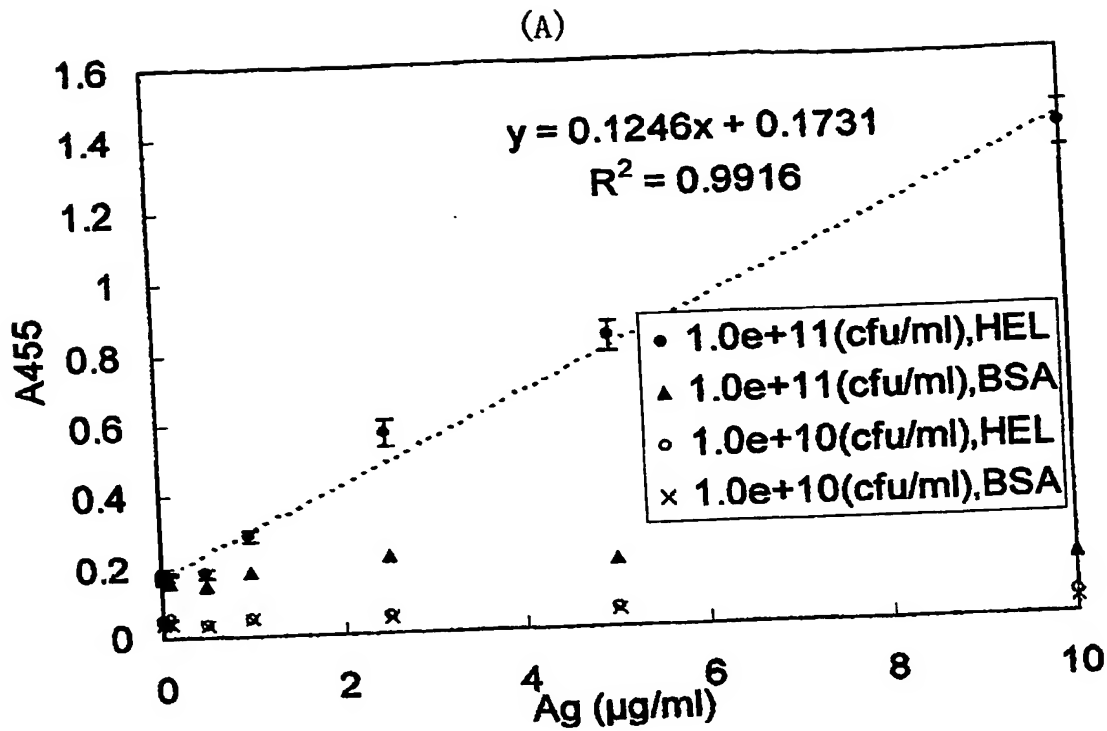
【図7】



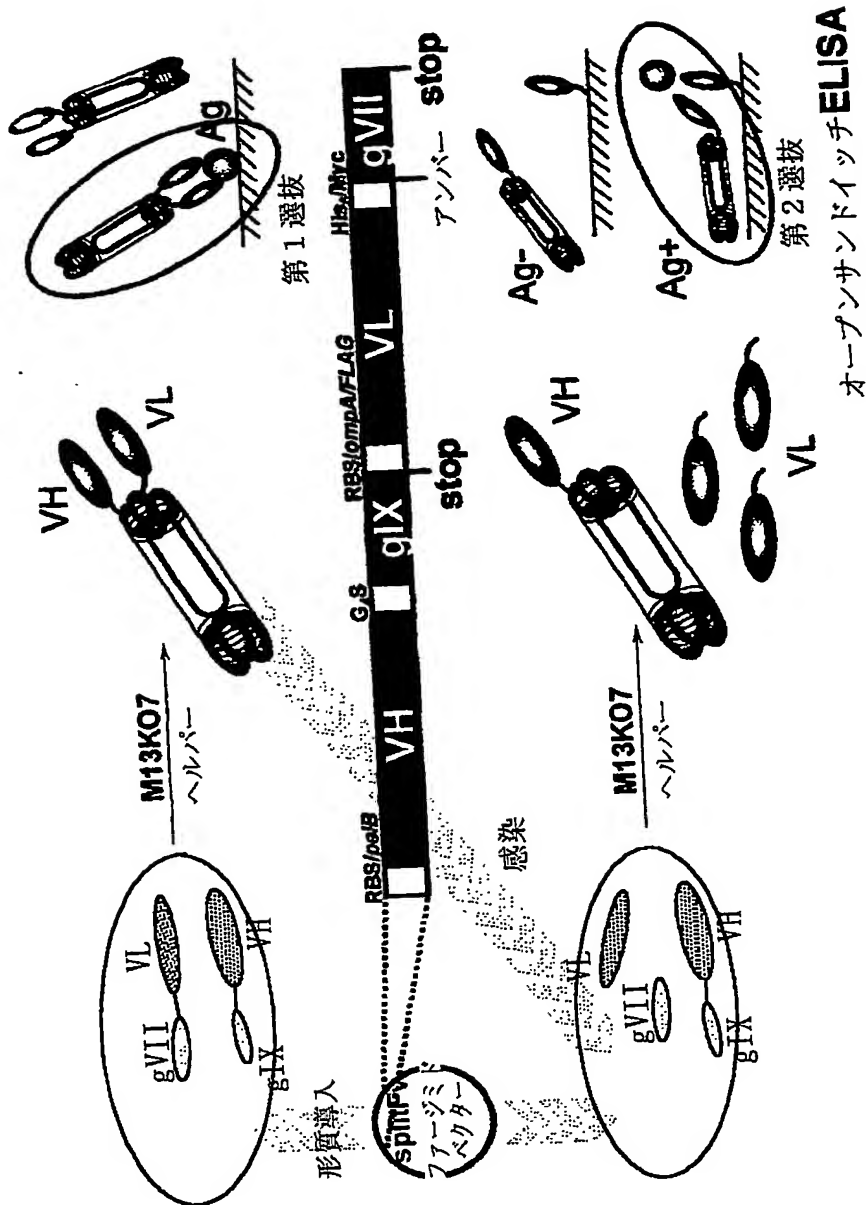
【図8】



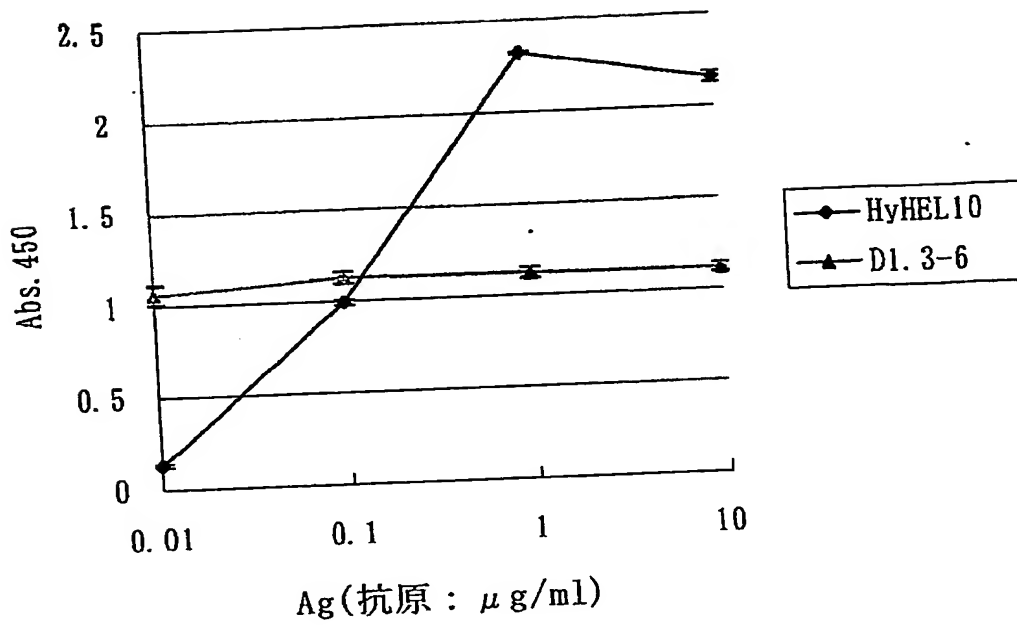
【図9】



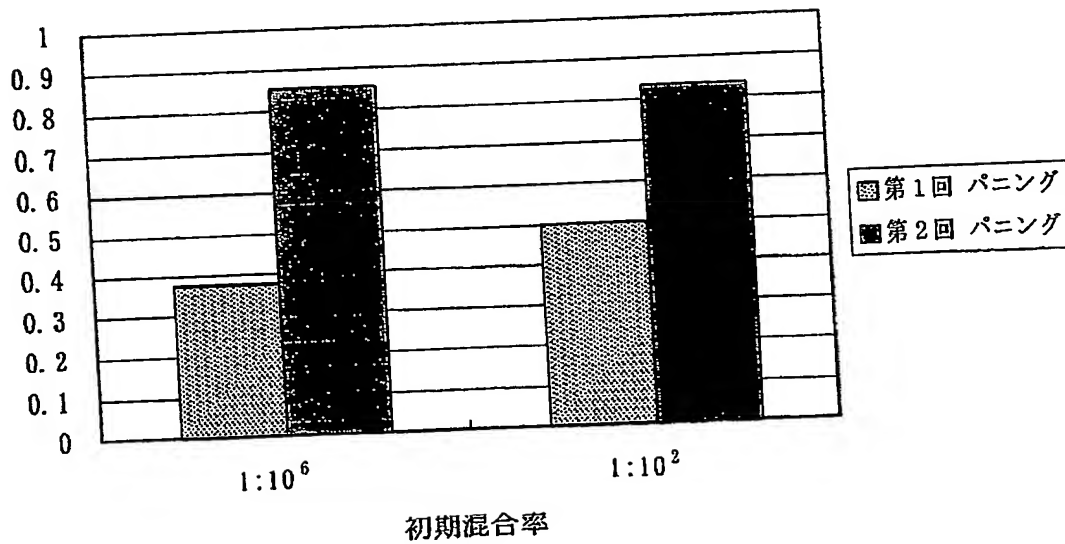
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗体可変領域のVH断片とVL断片の間の相互作用を測定するための新規な系を開発する。

【解決手段】 本発明により、抗体可変領域のVH断片とVL断片の間の相互作用を測定するための新規な方法が与えられた。本発明の方法は蛋白質の間の相互作用を検出する目的で、広く使用することが可能である。本発明の方法に従って、アンバーコドンを含むファージミドベクターによってアンバーサプレッサー株大腸菌を形質転換してファージを調製すると、VH・VL断片の両者がファージ粒子上に提示される。一方非アンバーサプレッサー株大腸菌を形質転換してファージを調製した際には、アンバーコドンが存在するために、VH断片のみがファージ粒子上に提示されてVL断片は培養上清中に分泌されるという提示切り替えが起こる。培養上清中に分泌されたVL断片を固相に固定化し、ファージ上に提示されたVH断片との相互作用を定量化することにより、VH断片とVL断片の間の相互作用を測定することが可能である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-237411
受付番号	50201215646
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成14年 8月19日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

391012327

【住所又は居所】

東京都文京区本郷7丁目3番1号

【氏名又は名称】

東京大学長

【代理人】

申請人

【識別番号】

100072051

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階

【氏名又は名称】

杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】

100059258

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階

【氏名又は名称】

杉村 暁秀

次頁無

特願2002-237411

出願人履歴情報

識別番号

[391012327]

1. 変更新月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1991年 1月22日

新規登録

東京都文京区本郷7丁目3番1号

東京大学長

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.